

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
7. Dezember 2000 (07.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 00/73798 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 33/543

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/04491

(22) Internationales Anmeldedatum:  
18. Mai 2000 (18.05.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
990/99 27. Mai 1999 (27.05.1999) CH

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): ZEPTOSENS AG [CH/CH]; Benkenstrasse 254, CH-4108 Witterswil (CH).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KRÖGER, Dietmar [DE/DE]; Passauer Strasse 39, D-81369 München (DE). VOGEL, Horst [DE/CH]; Chemin du Closelet 2, CH-1028 Préverenges (CH). PAWLAK, Michael [DE/DE]; Andelsbachstrasse 5, D-79725 Laufenburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: VESICLE CONTAINING POLYMERS AND SENSOR DETECTION METHODS BASED THEREON

(54) Bezeichnung: POLYMER-ENTHALTENDES VESIKEL UND DARAUF BASIERTE SENSOR-NACHWEISVERFAHREN

(57) Abstract: The invention relates to a functionalized, polymer-reinforced (sterically stabilized) vesicle which comprises a biological, biochemical or synthetic identifying element for identifying and binding a ligand. In addition, the inventive vesicle optionally contains labels which serve as signal-generating constituents in a bioanalytical detection method. The invention also relates to a method for producing said vesicle and to the use thereof in detection methods.

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der Erfindung ist ein funktionalisiertes, polymerverstärktes (sterisch stabilisiertes) Vesikel, welches ein biologisches oder biochemisches oder synthetisches Erkennungselement zur Erkennung und Bindung eines Liganden umfasst, und gegebenenfalls zusätzlich Label als signalerzeugende Komponenten in einem bioanalytischen Nachweisverfahren enthält, ein Verfahren zur jeweiligen Herstellung und dessen Verwendung in Nachweisverfahren.

## POLYMER-ENTHALTENDES VESIKEL UND DARAUF BASIERTE SENSOR-NACHWEISVERFAHREN

Gegenstand der Erfindung ist ein funktionalisiertes, polymerverstärktes (sterisch stabilisiertes) Vesikel, welches ein biologisches oder biochemisches Erkennungselement zur Erkennung und Bindung eines Liganden umfasst, ein Verfahren zur Herstellung und dessen Verwendung. Es besteht also ein Bedürfnis für die Entwicklung eines Reagens für bioanalytische Anwendungen sowohl in Lösung als auch an einer festen Oberfläche, welches die Funktionalität und native Konformation eines als Erkennungselement dienenden biologischen Moleküls, beispielsweise von Membranrezeptoren, für den Nachweis eines spezifisch daran bindenden Liganden, gewährleistet und zugleich unspezifische Wechselwirkungen mit diesem Erkennungselement minimiert.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein biologisches oder biochemisches Reagens, umfassend

A) ein Vesikel

B) ein oder mehrere an die innere und / oder äussere Oberfläche des Vesikels gebundene Polymermoleküle

C) mindestens ein an das Vesikel gebundenes oder adsorbiertes oder an das Polymermolekül gebundenes oder adsorbiertes biologisches oder biochemisches oder synthetisches Erkennungselement zur Erkennung und Bindung eines Liganden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein funktionalisiertes, polymerverstärktes (sterisch stabilisiertes) Vesikel, welches zusätzlich Label als signalerzeugende Komponenten in einem bioanalytischen Nachweisverfahren enthält, wobei diese ausgewählt sein können aus der Gruppe von ESR- oder NMR-Spinlabeln, Massenlabeln, elektrochemischen Labeln, Lumineszenzlabeln oder Fluoreszenzlabeln. Das mindestens eine Label als signalerzeugende Komponente kann sich dabei im Innern des Vesikels befinden oder an die äussere Hülle des Vesikels direkt oder über einen Spacer oder über das Polymere gebunden sein. Es können auch eine Vielzahl von gleichartigen Labeln, insbesondere von gleichartigen Lumineszenz- oder Fluoreszenzlabeln, mit dem Vesikel assoziiert sein. Für bestimmte Anwendungen, in denen Energietransfer zu einer Verbesserung der Unterscheidung des spezifischen Signals von den Hintergrundsignalen eingesetzt werden soll, kann es von Vorteil sein, wenn als signalerzeugende Komponenten mehrere Lumineszenz- oder Fluoreszenzlabel unterschiedlicher Emissionswellenlänge und gleicher oder unterschiedlicher

Anregungswellenlänge verwendet werden. Bei den Lumineszenz- oder Fluoreszenzlabeln kann es sich um herkömmliche Lumineszenz- oder Fluoreszenzlabel oder auch um sogenannte lumineszente oder fluoreszente Nanopartikel, basierend auf Halbleitern (W. C. W. Chan und S. Nie, "Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection", *Science* 281 (1998) 2016 – 2018) handeln.

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind Methoden zur Herstellung des besagten funktionalisierten Vesikels und dessen Verwendung in bioanalytischen Nachweisverfahren. Diese können ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus der Detektion optischer Signaländerungen, elektrochemischer Detektion, Impedanzspektroskopie, Elektronenspinresonanz, Kernspinresonanz, Schwingquarzmessungen oder einer Kombination dieser Verfahren.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemässen biologischen oder biochemischen Reagens, dadurch gekennzeichnet, dass man

- A) die für die Vesikelherstellung mittels Dialyse benötigten Lipidmoleküle,
  - B) eine oder mehrere an die innere und / oder äussere Hülle des Vesikels zu bindende Polymermoleküle und
  - C) mindestens ein an das Vesikel zu bindendes oder zu adsorbierendes oder an ein Polymermolekül zu bindendes oder zu adsorbierendes biologisches oder biochemisches oder synthetisches Erkennungselement zur Erkennung und Bindung eines Liganden
- in sequentiellen Mischungs- und Verdampfungsschritten zusammenbringt.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein bioanalytisches Nachweisverfahren unter Verwendung eines erfindungsgemässen biologischen oder biochemischen Reagens. Insbesondere kann dabei der Nachweis des Analyten mittels einer optischen Signaländerung erfolgen. Bevorzugt ist dabei, dass die Bestimmung der optischen Signaländerung mithilfe eines als Sensorplattform dienenden optischen Sensors erfolgt. Diese Sensorplattform ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus optischen Wellenleitersensoren und Oberflächenplasmonensensoren.

Bevorzugt ist, wenn die zu bestimmende optische Signaländerung auf der Änderung des effektiven Brechungsindex im Nahfeld der Sensoroberfläche beruht. Ebenfalls bevorzugt ist, wenn die zu bestimmende optische

Signaländerung auf einer im Nahfeld des Sensors erzeugten Lumineszenz oder Fluoreszenz beruht.

Als Sensorplattform kann insbesondere ein planarer oder faserförmiger Wellenleiter verwendet werden. Bevorzugt wird, wenn ein planarer Dünnschichtwellenleiter verwendet wird, welcher eine erste optisch transparente Schicht (a) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b) umfasst.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein bioanalytisches Nachweisverfahren unter Verwendung eines erfindungsgemässen biologischen oder biochemischen Reagens, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht in den als Sensorplattform dienenden Dünnschichtwellenleiter über ein oder mehrere Gitter (c) eingekoppelt wird.

Es kann von Vorteil sein, wenn sich zwischen den optisch transparenten Schichten (a) und (b) und in Kontakt mit Schicht (a) eine weitere optisch transparente Schicht (b') mit niedrigerem Brechungsindex als dem der Schicht (a) und einer Stärke von 5 nm - 1000 µm, vorzugsweise von 10 nm - 1000 nm, befindet. Die Zwischenschicht hat die Aufgabe einer Verringerung der Oberflächenrauigkeit unter der Schicht (a) oder der Verminderung des Eindringens des evaneszenten Feldes von in Schicht (a) geführtem Licht in die eine oder mehrere darunter liegende Schichten oder einer Verbesserung der Haftung der Schicht (a) auf der einen oder mehreren darunter liegenden Schichten oder der Verminderung von thermisch hervorgerufenen Spannungen innerhalb der optischen Sensorplattform oder der chemischen Isolation der optisch transparenten Schicht (a) von darunter liegenden Schichten mittels Abdichten von Mikroporen in der Schicht (a) gegen darunter liegende Schichten.

Es gibt eine Vielzahl von Methoden zur Aufbringung der biologischen oder biochemischen Erkennungselemente auf die optisch transparente Schicht (a). Beispielsweise kann dieses durch physikalische Adsorption oder durch elektrostatische Wechselwirkung erfolgen. Die Orientierung der Erkennungselemente ist dann im allgemeinen statistisch. Ausserdem besteht die Gefahr, dass bei unterschiedlicher Zusammensetzung der den Analyten enthaltenden Probe oder der im Nachweisverfahren eingesetzten Reagentien ein Teil der immobilisierten Erkennungselemente fortgespült wird. Daher kann es von Vorteil sein, wenn zur Immobilisierung biologischer oder

biochemischer Erkennungselemente (e) auf der optisch transparenten Schicht (a) eine Haftvermittlungsschicht (f) aufgebracht ist. Diese Haftvermittlungsschicht sollte ebenfalls optisch transparent sein. Insbesondere sollte die Haftvermittlungsschicht nicht über die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes aus der wellenleitenden Schicht (a) in das darüber liegende Medium hinausragen. Daher sollte die Haftvermittlungsschicht (f) eine Stärke von weniger als 200 nm, vorzugsweise von weniger als 20 nm, haben.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein bioanalytisches Nachweisverfahren mit einer Sensorplattform, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass der als Sensorplattform dienende Dünnschichtwellenleiter mehrere Messbereiche zur gleichzeitigen oder sequentiellen Bestimmung eines oder mehrerer Analyten aus einer oder mehreren Proben umfasst.

Durch räumlich selektive Aufbringung von biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen auf der Sensorplattform ist es möglich, räumlich getrennte Messbereiche (d) zu erzeugen. Im Kontakt mit einem lumineszenzfähigen Analyten oder eines mit dem Analyten um die Bindung an die immobilisierten Erkennungselemente konkurrierenden lumineszenzmarkierten Analogen des Analyten oder eines weiteren lumineszenzmarkierten Bindungspartners in einem mehrstufigen Assay werden diese lumineszenzfähigen Moleküle nur selektiv in den Messbereichen an die Oberfläche der Sensorplattform binden, welche durch die Flächen definiert werden, die von den immobilisierten Erkennungselementen eingenommen werden.

Für viele Anwendungen ist es von Vorteil, wenn die Gitterstruktur (c) ein diffraktives Gitter mit einer einheitlichen Periode ist. Der Resonanzwinkel zur Einkopplung des Anregungslichts über die Gitterstruktur (c) zu den Messbereichen ist dann im gesamten Bereich der Gitterstruktur einheitlich. Will man jedoch beispielsweise das Anregungslicht verschiedener Lichtquellen mit deutlich unterschiedlicher Wellenlänge einkoppeln, so können sich die entsprechenden Resonanzwinkel für die Einkopplung deutlich unterscheiden, was die Verwendung zusätzlicher Justierelemente in einem optischen System zur Aufnahme der Sensorplattform erforderlich machen kann oder zu räumlich sehr ungünstigen Koppelwinkeln führen kann. Beispielsweise zur Verringerung stark unterschiedlicher

Koppelwinkel kann es daher von Vorteil sein, wenn die Gitterstruktur (c) ein multidiffraktives Gitter ist.

Das Material der zweiten optisch transparenten Schicht (b) kann aus Glas, Quarz oder einem transparenten thermoplastischen Kunststoff aus der Gruppe bestehen, die von Polycarbonat, Polyimid oder Polymethylmethacrylat gebildet wird.

Zur Erzeugung eines möglichst starken evaneszenten Feldes an der Oberfläche der optisch transparenten Schicht (a) ist es wünschenswert, dass der Brechungsindex der wellenleitenden, optisch transparenten Schicht (a) wesentlich grösser als der Brechungsindex der benachbarten Schichten ist. Insbesondere ist es von Vorteil, wenn der Brechungsindex der ersten optisch transparenten Schicht (a) grösser als 2 ist.

Beispielsweise kann die erste optisch transparente Schicht (a) aus  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ,  $\text{HfO}_2$ , oder  $\text{ZrO}_2$  bestehen. Besonders bevorzugt wird, wenn die erste transparente optische Schicht (a) aus  $\text{TiO}_2$ , oder  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  besteht.

Neben dem Brechungsindex der wellenleitenden optisch transparenten Schicht (a) ist deren Dicke der zweite massgebliche Parameter zur Erzeugung eines möglichst starken evaneszenten Feldes an deren Grenzflächen zu benachbarten Schichten mit niedrigerem Brechungsindex. Dabei nimmt die Stärke des evaneszenten Feldes mit abnehmender Dicke der wellenleitenden Schicht (a) zu, solange die Schichtdicke ausreicht, um mindestens einen Mode der Anregungswellenlänge zu führen. Dabei ist die minimale "Cut-off"-Schichtdicke zur Führung eines Modes abhängig von der Wellenlänge dieses Modes. Sie ist für längerwelliges Licht grösser als für kurzwelliges Licht. Mit Annäherung an die "Cut-off"-Schichtdicke nehmen allerdings auch ungewünschte Ausbreitungsverluste stark zu, was die Auswahl der bevorzugten Schichtdicke zusätzlich nach unten begrenzt. Bevorzugt sind solche Schichtdicken der optisch transparenten Schicht (a), welche nur die Führung von 1 bis 3 Moden einer vorgegebenen Anregungswellenlänge ermöglichen, ganz besonders bevorzugt sind Schichtdicken, welche zu monomodalen Wellenleitern für diese Anregungswellenlänge führen. Dabei ist klar, dass sich der diskrete Modencharakter des geführten Lichts nur auf die transversalen Moden bezieht.

Diese Anforderungen führen dazu, dass vorteilhaft die Dicke der ersten optisch transparenten Schicht (a) 40 nm bis 300 nm beträgt. Ganz besonders vorteilhaft beträgt die Dicke der ersten optisch transparenten Schicht (a) 70 nm bis 160 nm.

Bei vorgegebenen Brechungsindices der wellenleitenden, optisch transparenten Schicht (a) und der benachbarten Schichten ist der Resonanzwinkel für die Einkopplung des Anregungslichts entsprechend der oben genannten Resonanzbedingung abhängig von der einzukoppelnden Beugungsordnung, der Anregungswellenlänge sowie der Gitterperiode. Zur Erhöhung der Einkoppleffizienz ist die Einkopplung der ersten Beugungsordnung vorteilhaft. Neben der Höhe der Beugungsordnung ist für die Höhe der Einkoppleffizienz die Gittertiefe massgeblich. Prinzipiell vergrößert sich die Koppleffizienz mit steigender Gittertiefe. Da der Prozess der Auskopplung völlig reziprok zur Einkopplung erfolgt, erhöht sich jedoch zugleich auch die Auskoppleffizienz, so dass es zur Anregung von Lumineszenz in einem auf der Gitterstruktur (c) angeordneten oder an diese angrenzenden Messbereich (d), in Abhängigkeit von der Geometrie der Messbereiche und der eingestrahlten Anregungslichtbündel, ein Optimum gibt. Aufgrund dieser Randbedingungen ist es von Vorteil, wenn das Gitter (c) eine Periode von 200 nm – 1000 nm aufweist und die Modulationstiefe des Gitters (c) 3 nm bis 100 nm, bevorzugt 10 nm bis 30 nm beträgt.

Weiterhin wird bevorzugt, dass das Verhältnis von Modulationstiefe zur Dicke der ersten optisch transparenten Schicht (a) gleich oder kleiner als 0,2 ist.

Zur Verstärkung einer Lumineszenz oder zur Verbesserung des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses kann es weiterhin von Vorteil sein, wenn zwischen der optisch transparenten Schicht (a) und den immobilisierten biologischen oder biochemischen Erkennungselementen eine dünne Metallschicht, vorzugsweise aus Gold oder Silber, gegebenenfalls auf einer zusätzlichen dielektrischen Schicht mit niedrigerem Brechungsindex als der Schicht (a), beispielsweise aus Silica oder Magnesiumfluorid, aufgebracht ist, wobei die Dicke der Metallschicht und der eventuellen weiteren Zwischenschicht so ausgewählt ist, dass ein Oberflächenplasmon bei der

Anregungswellenlänge und / oder der Lumineszenzwellenlänge angeregt werden kann.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein optisches System zur Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen, mit

- mindestens einer Anregungslichtquelle
- einer Sensorplattform nach mindestens einer der genannten Ausführungen
- mindestens einem Detektor zur Erfassung des von dem mindestens einem oder mehreren Messbereichen (d) auf der Sensorplattform ausgehenden Lichts.

Dabei ist es von Vorteil, wenn das von der mindestens einen Lichtquelle ausgesandte Anregungslicht kohärent ist und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf die einen oder mehreren Messbereiche eingestrahlt wird.

Im Falle unzureichender Intensität einer einzigen Lichtquelle oder des Bedarfs nach Lichtquellen unterschiedlicher Emissionswellenlängen, beispielsweise für biologische Applikationen, ist es vorteilhaft, wenn als Anregungslichtquellen zwei oder mehrere kohärente Lichtquellen mit gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet werden.

Um die Signale von einer Vielzahl von Messbereichen getrennt aufzunehmen, wird bevorzugt, dass zur Detektion mindestens ein ortsauflösender Detektor verwendet wird.

Dabei kann als der mindestens eine ortsauflösende Detektor mindestens ein Detektor aus der Gruppe verwendet werden, die von CCD-Kameras, CCD-Chips, Photodioden-Arrays, Avalanche-Dioden-Arrays, Multichannelplates und Vielkanal-Photomultipliern gebildet wird.

In dem erfindungsgemässen optischen System nach einer der genannten Ausführungen können zwischen der einen oder mehreren Anregungslichtquellen und der Sensorplattform nach einer der vorgenannten Ausführungen und /oder zwischen besagter Sensorplattform und dem einen oder mehreren Detektoren optische Komponenten aus der Gruppe verwendet werden, die von Linsen oder Linsensystemen zur Formgestaltung der übertragenen Lichtbündel, planaren oder gekrümmten Spiegeln zur Umlenkung und gegebenenfalls zusätzlich zur Formgestaltung



von Lichtbündeln, Prismen zur Umlenkung und gegebenenfalls zur spektralen Aufteilung von Lichtbündeln, dichroischen Spiegeln zur spektral selektiven Umlenkung von Teilen von Lichtbündeln, Neutralfiltern zur Regelung der übertragenen Lichtintensität, optischen Filtern oder Monochromatoren zur spektral selektiven Übertragung von Teilen von Lichtbündeln oder polarisationselektiven Elementen zur Auswahl diskreter Polarisationsrichtungen des Anregungs- oder Lumineszenzlichts gebildet werden.

Für eine Reihe von Anwendungen ist es von Vorteil, wenn die Einstrahlung des Anregungslichts in Pulsen mit einer Dauer zwischen 1 fsec und 10 Minuten erfolgt.

Für kinetische Messungen oder für die Diskriminierung rasch abklingender Fluoreszenz von fluoreszenten Verunreinigungen in der Probe oder in Materialien von Komponenten des optischen Systems oder der Sensorplattform selbst kann es von Vorteil sein, wenn das Emissionslicht aus den Messbereichen zeitlich aufgelöst gemessen wird.

Es ist auch möglich, dass die Einstrahlung des Anregungslichts auf und Detektion des Emissionslichts von einem oder mehreren Messbereichen sequentiell für einzelne oder mehrere Messbereiche erfolgt. Dabei kann die sequentielle Anregung und Detektion unter Verwendung beweglicher optischer Komponenten erfolgen, die aus der Gruppe von Spiegeln, Umlenkprismen und dichroischen Spiegeln gebildet wird. Eine andere mögliche Ausführungsform ist, dass die Sensorplattform zwischen Schritten der sequentiellen Anregung und Detektion bewegt wird. In diesem Fall können die eine oder mehreren Anregungslichtquellen und die zur Detektion verwendeten Komponenten räumlich fixiert sein.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein vollständiges analytisches System zum Lumineszenznachweis eines oder mehrerer Analyten in mindestens einer Probe auf einem oder mehreren Messbereichen auf einer Sensorplattform, umfassend einen optischen Schichtwellenleiter, mit

- einer Sensorplattform nach einer der vorgenannten Ausführungsformen,
- einem optischen System nach einer der vorgenannten Ausführungsformen, sowie

- Zuführungsmitteln, um die eine oder mehrere Proben mit den Messbereichen auf der Sensorplattform in Kontakt zu bringen.

Dabei kann die Zufuhr der Proben und gegebenenfalls zusätzlichen Reagentien in parallelen oder gekreuzten Mikrokanälen, unter Einwirkung von Druckunterschieden oder elektrischen oder elektromagnetischen Potentialen erfolgen.

Für die quantitative und / oder qualitative Bestimmung des Analyten in dem erfindungsgemässen bioanalytischen Nachweisverfahren ist es auch möglich, dass das eine oder die mehreren zum Nachweis des Analyten verwendeten Lumineszenz- oder Fluoreszenzlabel an den Analyten oder in einem kompetitiven Assay an einen Analogen des Analyten oder in einem mehrstufigen Assay an einen der Bindungspartner des Analyten oder der eingesetzten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente gebunden sind.

Bei den vorgenannten Verfahren ist es möglich, dass (1) die isotrop abgestrahlte Lumineszenz oder (2) in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelte und über die Gitterstruktur (c) ausgekoppelte Lumineszenz oder Lumineszenzen beider Anteile (1) und (2) gleichzeitig gemessen werden.

Das erfindungsgemässe bioanalytische Nachweisverfahren dient der gleichzeitigen oder sequentiellen, quantitativen oder qualitativen Bestimmung eines oder mehrerer Analyten aus der Gruppe von Antikörpern oder Antigenen, Rezeptoren oder Liganden, Chelatoren oder "Histidin-Tag-Komponenten", Oligonukleotiden, DNA- oder RNA-Strängen, DNA- oder RNA-Analoga, Enzymen, Enzymcofaktoren oder Inhibitoren, Lektinen und Kohlehydraten.

Die zu untersuchenden Proben können natürlich vorkommende Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Lymphe oder Urin oder Eigelb sein.

Eine zu untersuchende Probe kann aber auch eine optisch trübe Flüssigkeit, Oberflächenwasser, ein Boden- oder Pflanzenextrakt, eine Bio- oder Syntheseprozessbrühe sein.

Die zu untersuchenden Proben können auch aus Gewebeteilen lebender oder verstorbener Organismen entnommen sein.

Lipidvesikel mit ihren doppelschichtigen Membranen werden bis jetzt hauptsächlich in zweierlei Hinsicht angewendet.

Zum einen werden Lipidvesikel in der Forschung als Modellsysteme für biologische Membranen eingesetzt. Die Vesikel dienen dann als Trägersysteme für wasserunlösliche Membranproteine und -rezeptoren.

Zum anderen werden Lipidvesikel kommerziell im Pharmageschäft als Transportsysteme von therapeutisch wirksamen Reagenzien für die gezielte therapeutische Behandlung von Krankheiten benutzt.

Nachfolgend wird ausschliesslich die Bezeichnung "Vesikel" benutzt, unabhängig von dem unterschiedlichen Gebrauch beider Bezeichnungen in der Literatur. Im allgemeinen enthalten vesikelbildende Lipide amphiphatische Lipide mit hydrophoben und polaren Gruppen.

Nachfolgend werden die hydrophoben Anteile als "Lipidketten" und die hydrophilen oder polaren Anteile als "polare Kopfgruppen" bezeichnet. In wässriger Umgebung können solche Lipidmoleküle spontan Doppelschichtstrukturen ausbilden, wie beispielsweise Lipidvesikel.

Die Struktur und Charakterisierung solcher Vesikel wird in Standard-Lehrbüchern wie beispielsweise in R. B. Gennis: "Biomembranes", *Advanced Texts in Chemistry* (Herausgeber: C. R. Cantor), Springer, Heidelberg 1989, beschrieben.

Die oben genannten Lipidmoleküle können auch leicht in bereits ausgebildete Doppelschichten oder Vesikel derart eingefügt werden, dass die Lipidketten in das hydrophobe Innere der Lipid-Doppelschicht und die polaren Kopfgruppen in die von den Kopfgruppen der vorhandenen Vesikel gebildete Region integriert werden. Die vesikelbildenden Lipide besitzen vorzugsweise zwei Kohlenwasserstoffketten mit einer typischen Länge von 14 bis 22 Kohlenstoffatomen mit unterschiedlichem, ungesättigtem Charakter, beispielsweise mit Alkyl-Ketten.

Solche Lipidmoleküle können beispielsweise aus biologischen Membranen unterschiedlicher Organismen isoliert werden und werden als "natürlich vorkommende Lipide" bezeichnet. Typische Beispiele sind Glycero-

phospholipide wie Phosphatidylcholin, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylserin, Phosphatidsäure und Sphingomyelin. Andere natürlich vorkommende Lipide umfassen die Klassen von Glycolipiden, Sterolen wie Cholesterol, Cardiolipin, Plasmalogen und Lipide, welche in Archaeobakterien vorkommen, beispielsweise solche mit an Äthergruppen gekoppelten Kohlenwasserstoffketten, verzweigten Kohlenwasserstoffketten oder Kohlenwasserstoffketten mit aliphatischen Ringstrukturen oder sogenannten bipolaren Lipiden, bei denen ein Lipidmolekül sich über eine Lipiddoppelschicht erstreckt (für eine detaillierte Beschreibung siehe beispielsweise R. B. Gennis: "Biomembranes", *Advanced Texts in Chemistry* (Herausgeber: C. R. Cantor), Springer, Heidelberg 1989).

Weitere Beispiele umfassen künstliche Lipide, wie sie beispielsweise in einer Vielzahl von Ausführungen von Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA, kommerziell erhältlich sind.

Viele der oben genannten natürlich vorkommenden Lipide können auch chemisch synthetisiert werden.

Zusätzlich gibt es auch synthetisch hergestellte Lipide, welche nicht zu natürlich vorkommenden Lipidklassen gehören. Sie können aktivierbare oder polymerisierbare Gruppen enthalten, sowohl in den Lipidketten als auch in den polaren Kopfgruppen. Weitere Beispiele sind positiv geladene Lipide wie Dodecylammoniumbromid (DODAB) oder Boloamphiphile sowie Lipide, welche fluoridierte oder halogenierte Lipidkohlenwasserstoffketten enthalten.

Ein Überblick über ein breites Spektrum synthetischer Lipide wird gegeben in J.-H. Furhop und J. Köning: "Membranes and Molecular Assemblies: The Synkinetic Approach", *Monographs in Supramolecular Chemistry* (Herausgeber: J. F. Stoddart), The Royal Society of Chemistry, 1994.

Synthetische Lipide sind ideal geeignet zur Bildung von Vesikeln, entweder als reine Verbindungen, als Mischungen unterschiedlicher synthetischer Lipide oder in Mischungen, welche synthetische und natürlich vorkommende Lipide umfassen.

Vesikel werden typischerweise nach einem der nachfolgenden Protokolle oder in deren Kombination hergestellt (wie beispielsweise beschrieben von F. Szoka und D. Papahadjopoulos, *Rev. Biophys. Bioeng.* 9 (1980) 467 – 508).

Multilamellare Vesikel (MLV's) werden typischerweise durch Rehydrierung getrockneter Lipidfilme oder -pulver unter verschiedenen Bedingungen hergestellt, beispielsweise unter Zugabe von Wasser oder einer wässrigen Pufferlösung zu einem Lipidfilm, der zuvor in einem geeigneten Gefäss aus einer Lipidlösung in einem organischen Lösungsmittel durch dessen Verdampfung abgeschieden wurde. Abhängig von der Herstellungsmethode, wie beispielsweise Rühren, Schütteln, Beschallen, und der Art des Lipids, der Ionenstärke oder der Konzentration, um beispielhaft nur einige Parameter zu nennen, werden MLV's unterschiedlicher Grösse gebildet.

Beispiele für weitere Herstellungsmethoden sind die "solvent spherule method", die Umkehrphasenmethode oder Vesikelfusion durch Gefrieren / Auftauen oder Dehydrierung / Rehydrierung (siehe z. B. D. D. Lasic, Biochem. J. 256 (1988) 1 – 11).

Kleine unilamellare Vesikel (*small unilamellar vesicles* SUV's) werden mittels Beschallung von MLV's oder durch Extrusion (extruding) von MLV's durch Filter hergestellt. Im letzteren Fall ist der Durchmesser der Vesikel typischerweise von gleicher Grössenordnung wie die Porengrösse der verwendeten Filter. Eine andere sehr nützliche Herstellungsmethode ist die Detergens-Verdünnungsmethode. Dabei werden Lipide oder MLV's in Gegenwart von Detergentien gelöst, welche nachfolgend mittels Verdünnung, Dialyse, Chromatographie, Adsorption, Ultrafiltration oder Zentrifugierens entfernt werden, so dass sich schliesslich SUV's bilden.

Grosse unilamellare Vesikel (*large unilamellar vesicles* LUV's) werden typischerweise hergestellt durch Entfernen eines Detergens oder durch Injektionsmethoden, wobei in organischen Lösungsmitteln gelöste Lipide in Wasser oder eine wässrige Pufferlösung injiziert werden, oder durch Umkehrphasen-Verdampfungsmethoden. Im letzteren Fall werden LUV's durch Entleerung von Tröpfchen organischer Lösungsmittel, in denen die Lipide gelöst waren und welche in der wässrigen Phase dispergiert sind, gebildet.

Sehr grosse Vesikel werden beispielsweise durch erschütterungsfreies Anschwellen von gleichförmig getrockneten Lipidfilmen in wässriger Lösung hergestellt.

Für das erfindungsgemässe biologische oder biochemische Reagens werden Vesikel bevorzugt mit einem Durchmesser von 20 – 1000 nm, besonders bevorzugt von 50 – 400 nm, ganz besonders bevorzugt von 50 – 200 nm.

Die unter B) erwähnten Polymere dienen sowohl der Stabilisierung des Vesikels als auch der Verminderung unspezifischer Bindung an die Oberfläche. Es sei insbesondere zu erwähnen, dass das erfindungsgemässe biologische oder biochemische Reagens hydrophile Polymermoleküle enthält, welche an die innere und / oder äussere Oberfläche des Vesikels gebunden sind. Das hydrophile Polymere ist an das Vesikel zwecks Erzeugung einer hydrophilen Schale gebunden. Diese Schale kann als eine sterische Barriere gegen die Diffusion von Molekülen in das Vesikel hinein oder aus diesem heraus angesehen werden. Daher werden solche Vesikel auch als sterisch stabilisierte Vesikel bezeichnet. Idealerweise haben die vesikelgebundenen Polymeren eine hohe konformationale Flexibilität und ermöglichen eine hohe Übergangsrate zwischen verschiedenen Konformationen, was einer hohen Entropie entspricht. Bei der Annäherung oder gar Bindung eines solchen Vesikels an ein Partikel oder eine makroskopische Oberfläche, wie beispielsweise die Oberfläche eines Sensors, entspricht die Verminderung der konformationellen Freiheit des Polymeren einem Entropieverlust. Dieses führt zu einer verminderten (unspezifischen) Bindung an andere Partikel oder makroskopische Oberflächen. Man bezeichnet diesen Effekt als "entropische Abschirmung" (D. D. Lasic und F. Martin: "Stealth Liposomes", CRC Press, Boca Raton, 1995). Diese Vesikel können sich dem mononuklearen Phagocytensystem entziehen und werden auch als "Stealth Vesicles" bezeichnet. Sie finden Einsatz zum Transport pharmazeutischer Wirkstoffe in einem Organismus. Im Verständnis dieser Erfindung werden solche Vesikel als "sterisch stabilisierte Vesikel" (SSV's) bezeichnet.

Das Polymermolekül kann an die Vesikeloberfläche durch eines der folgenden Verfahren oder eine Kombination dieser Verfahren gebunden werden:

- (1) Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen positiv (oder negativ) geladenen Anteilen des Polymeren und negativ (oder positiv) geladenen Gruppen der Vesikeloberfläche. Die elektrischen Ladungen des Vesikels können beispielsweise von den polaren Lipid-Kopfgruppen oder anderen

geeigneten Verbindungen, wie beispielsweise natürlichen oder künstlichen Polypeptiden, in oder auf der Vesikel-Doppelschicht, stammen.

- (2) Durch kovalente Bindung des Polymermoleküls an die polaren Kopfgruppen der Lipidmoleküle, welche als Anker zur Einfügung in die Lipid-Doppelschicht des Vesikels dienen. Geeignete funktionale Gruppen an Lipiden sind Aminogruppen, z.B. Diacylglycerophosphatidylethanolamin, oder SH-Gruppen oder OH-Gruppen natürlicher oder synthetischer Lipidmoleküle. Die Polymeren können sowohl direkt an die Lipidmoleküle oder über Spacer-Moleküle zwischen den Lipidmolekülen oder lipidähnlichen Molekülen gebunden sein. Einige dieser Verbindungen sind mit aktiven Kopfgruppen kommerziell erhältlich, welche beispielsweise reaktiv gegenüber Aminen oder Thiolen sind. Beispiele umfassen Succinimid-Derivate, Pyridinylthio-Derivate oder Maleimid-Derivate und werden zum Teil beispielsweise von Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA, vertrieben. Weitere, kommerziell nicht erhältliche Beispiele wurden beschrieben in G. Brink et al., Biochem. Biophys. Acta 1196 (2, 1994) 227 – 230.
- (3) Andere geeignete Verankerungsmoleküle sind natürlich vorkommende Transmembranproteine oder membranüberspannende Polypeptide oder membran-assoziierte Proteine oder Polypeptide oder deren synthetisch hergestellte Analoga. Besagte Membranproteine oder -polypeptide werden auch als der hydrophobe Kern ("core") der Membran bezeichnet, beispielsweise im Fall von membranüberspannenden oder Transmembran-Proteinen oder Polypeptiden. Periphere Protein- oder Polypeptidmoleküle sind mit der Membran vorwiegend durch ionische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken oder hydrophobe Wechselwirkungen verbunden, sowie in einigen Fällen über Lipidanker, welche kovalent an ein Proteinmolekül gebunden sind (siehe L. Stryer: "Biochemistry", 4. Ausgabe, Freeman (1995) S. 275 ff.).

Verschiedene hydrophile Polymere eignen sich für eine Bindung an Vesikel, von denen nachfolgend einige Beispiele beschrieben werden.

#### (1) Ungeladene Polymere

Die Verwendung von Polyethylenglycolen und deren Derivaten mit "Stealth Vescicles" wird beschrieben in D. D. Lasic und F. Martin: "Stealth

Liposomes", CRC Press, Boca Raton, 1995. In den US 5534241, US 5770222 und US 5891468 werden vesikelgebundene Polyethylenglycole oder ähnliche hydrophile Polymere als Teil von Diblock-Copolymeren, bestehend aus hydrophilen und hydrophoben Polymeren, beschrieben, um die hydrophoben Polymere sowie in den Vesikeln eingeschlossene Wirkstoffe einzuschliessen und abzuschirmen und unter geeigneten physiologischen Konditionen durch Öffnung der hydrophilen Polymere zu entlassen.

(2) Elektrisch geladene Polymeren

Es können negativ oder positiv geladene oder auch zwitterionische Polymeren verwendet werden. Typische Beispiele sind Polypeptide und Polysulf oxide, welche ebenso wie weitere Beispiele in der US 5770222 genannt werden.

(3) Kohlenhydrate und deren Derivate

Beispiele sind Chitin / Chitosan-dextran, Stärke und ähnliche Polymere, wie sie in der US 5891468 benannt sind.

(4) Dendritische hydrophile Polymere

Typische Beispiele dieser Klasse werden in G. R. Newkome, C. N. Moorefield und F. Vögtle: "Dendritic Molecules", Verlag Chemie (1996) beschrieben.

Es gibt zwei verschiedene Hauptanwendungsgebiete für Lipid-Vesikel. Das erste Anwendungsgebiet ist die Verwendung von Lipid-Vesikeln als Modellsysteme für biologische Membranen, vor allem im Bereich der Grundlagenforschung (siehe beispielsweise R. B. Gennis: "Biomembranes", *Advanced Texts in Chemistry* (Herausgeber: C. R. Cantor), Springer, Heidelberg (1989)). Bei dieser Anwendung dienen die Vesikel vorwiegend als Träger wasserunlöslicher Membranproteine und -rezeptoren, wie zum Beispiel Ionenkanalrezeptoren (z.B. nAchR = Acetylcholinrezeptor, 5HT<sub>3</sub>-Rezeptor, Glutamat-Rezeptor, GABA Rezeptor), G-Protein gekoppelte Rezeptoren (z.B. Neurokinin-Rezeptoren, Chemokine-Rezeptoren,  $\beta$ -adrenergische Rezeptoren), Membranenzyme (z.B. Tyrosinkinasen, Adenylatcyclasen) und Membrantransporter (z.B. ATPasen)



Das weitere Hauptanwendungsgebiet betrifft die Verwendung von Vesikeln als Träger oder zur Darreichung therapeutischer Wirkstoffe zur gezielten Behandlung von Krankheiten. Für diesen Einsatz ist die Verwendung von Vesikeln seit mehr als 20 Jahren bekannt. Die meisten frühen Anwendungen beruhen auf sogenannten konventionellen Vesikeln, welche typischerweise zusammengesetzt sind aus wenigen neutralen oder negativ geladenen unterschiedlichen Lipiden (meistens Phospholipiden) und / oder Cholesterol. Im Einsatz für die Wirkstoffverabreichung haben diese konventionellen Vesikel eine sehr kurze Zirkulationszeit im Blut. Bei der in-vivo-Verabreichung zeigen sie eine starke Tendenz zur schnellen Akkumulation in den phagozytischen Zellen des mononuklearen Phagozytensystems. Zur Überwindung der nachteiligen kurzen Zirkulationszeit wurden hydrophile Polymere an das Vesikel gebunden, wie bereits oben erwähnt.

Um die Vesikel gezielter zum Gewebe zu bringen, wo sie appliziert werden sollen, werden Antikörper oder Antikörperfragmente ( $F_{AB}$ ) als spezifische Erkennungselemente an das Vesikel gebunden. Nach in-vivo-Verabreichung zirkulieren diese Vesikel im Blutstrom und binden mittels der an sie gebundenen Antikörper an das entsprechende Antigen, welches spezifisch im Zielgewebe vorkommt, was zu einer Aufkonzentrierung der Vesikel und damit auch der von ihnen transportierten Wirkstoffe bei diesem Gewebe führt. Diese Vesikel werden entsprechend als Immuno-Liposome bezeichnet. Dabei können die Antikörper entweder direkt oder über sogenannte Spacer-Moleküle an die Lipide des Vesikels gebunden sein. Als dieser Spacer kann auch ein Polymeres wie Polyethylenglycol (PEG), verwendet zur Bildung von SSVs (sterically stabilized vesicles), eingesetzt werden, so dass der Antikörper am Ende der Polymerenkette gebunden ist. Andere bekannte Beispiele umfassen die direkte Bindung des Antikörpers (oder über ein kurzes Spacer-Molekül) an ein Lipid einer SSV derart, dass sich der Antikörper innerhalb der hydrophilen Polymerenhülle befindet.

So werden in der WO 94/21235 Liposomenzusammensetzungen für Patientenbehandlung beansprucht, die eine äussere, hydrophile Schicht von PEG (Molekulargewicht 1000 – 10000 Dalton) tragen und Erkennungselemente, sogenannte Effektoren, daran kovalent gebunden haben. Die PEG-Hülle wird beansprucht, um den Abbau der Vesikel im Blutstrom zu unterbinden. Die Effektoren bestehen aus nieder- bis mittelgrossen Immunoerkennungselementen, nämlich  $F_{AB}$ -Fragmenten,

Glykoproteinen, Zytokinen, Polysacchariden oder verschiedenen Peptiden oder Peptidhormonen. In der WO 97/35561 werden mit einer wasserlöslichen Polymerhülle stabilisierte, biologisch aktivierte Liposomen für den therapeutischen Einsatz beansprucht. Dabei sind biologische, amphiphile Erkennungselemente in aktiver Form nicht-kovalent, also über Physisorption, mit den polymer-stabilisierten Liposomen verbunden. Im speziellen Fall ist das Erkennungselement ein Peptid, ein 'growth hormone releasing factor'. Bevorzugt werden unilamellare Liposomen mit einem Durchmesser von weniger als 300 nm, hergestellt über Extrusion. Bevorzugt wird als Polymer PEG benutzt, das in Form eines kovalent gekoppelten PEG-Lipids in der liposomenformenden Membran vorliegt. Im weiteren Sinn wird eine Liposomenzusammensetzung für diagnostische Zwecke beansprucht, die zusätzlich Label zu Detektionszwecken beinhaltet. Als detektierbare Marker werden Fluoreszenzmarker, radioaktive Label, Farbstoffe und Komponenten zur Signalverstärkung in der Kernspinresonanz, angegeben. Die Methode und Position der Anknüpfung der Label an das Vesikel sind nicht spezifiziert.

In einer weiteren Variante, US 589 1468, werden polymer-stabilisierte Vesikel für den therapeutischen Einsatz beansprucht, bei denen Liganden für die Erkennung von Zellrezeptoren am Ende der Polymerketten gebunden sind. Nach erfolgter Zielerkennung über Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung und anschliessender Fusion des Vesikels mit der Zielmembran, soll das Vesikel zusätzlich die Funktion haben, die hydrophilen Polymerketten zu entlassen. In der WO 97/33618 werden u.a. Vesikel für intrazelluläre Arzneimittelführung speziell für therapeutische Zwecke der Krebstherapie, welche über T-Lymphozyten vermittelt wird, beansprucht, wobei die Erkennungselemente über eine Kombination Spacer-Polymer-Spacer angebracht sind. Als Polymer dient speziell HPMA-Copolymer. Als Erkennungselemente werden u.a. Peptide, Zellgifte, Nukleinsäuren, Antigene und Arzneimittel beschrieben. In Nachfolgepatenten wurden die Erweiterung auf PEG als Polymer eingeführt (WO 98/51336) und im weiteren das Spektrum der Anwendungen erweitert, z.B. ein Interleukin 2 Peptid (IL2) als Ligand für IL2 T-Zellen Membranrezeptorerkennung (WO 99/07324).

Die oben beschriebenen Vesikel und deren Einsatzgebiete beziehen sich bisher ausschliesslich auf den therapeutischen Einsatz mit der Hauptfunktion eines Vesikels als Träger bzw. Transportvehikel. Der

Einsatz von Vesikeln im bioanalytischen Bereich ist nur vereinzelt beschrieben. So werden in der WO 97/39736 Vesikel als Reagenzien für Immunoassays beschrieben, um Patientenproben zu analysieren. Allgemein beansprucht werden hier Vesikel mit assoziierten Liganden zur Detektion von Analytmolekülen, wobei die Liganden aus Proteinen, Peptiden, Antikörpern oder Fragmenten davon sowie aus Nukleinsäuren bestehen können. Speziell sind die Liganden kleinere Haptenmoleküle für die Immunoerkennung, die im besonderen in Form von Haptenlipiden kovalent mit dem Vesikel verbunden sind. Die Signaldetektion im Assay erfolgt durch Anbinden des Vesikel-Reagens an eine mit entsprechenden biologischen Rezeptoren bestückte, harte Oberfläche in Form von Beads, Partikeln oder einer Mikrotiterplattenwand. Die Signalerzeugung entsteht durch Anbinden eines in Lösung befindlichen, sekundären Labels an das Liposom, nach erfolgter Analyterkennung, z.B. in einem Sandwichassay, wobei das Label ein fluoreszierendes oder lumineszierendes Molekül, ein Farbstoff, oder ein signalerzeugendes Enzym, z.B. eine alkalische Phosphatase ist. Anstelle durch Bindung an eine makroskopische, feste Oberfläche kann die spezifische Bioerkennung auch durch Bindung an ein sekundäres Vesikel erfolgen, das den entsprechenden Rezeptoren trägt. In jedem Fall soll die spezifische Liganden-Rezeptor-Bindung in Anwesenheit des Vesikels während der Analyse aufrechterhalten bleiben. Anzumerken ist, dass im beschriebenen Fall keine zusätzlichen Polymeren zur Stabilisierung des Liposoms verwendet und beschrieben werden.

Als weitere Anwendung ist die Verwendung von Vesikeln zur Signalverstärkung in bioanalytischen Nachweismethoden von einigen Gruppen beschrieben worden. So werden in S. A. Choquette et al.: "Planar waveguide immunosensor with fluorescent liposome amplification", *Analytical Chemistry* 64 (1992) 55 – 60, Vesikel in fluoreszenzbasierenden Immunoassays auf planaren Wellenleitern beschrieben. Dabei wird ein kompetitives Assay-Verfahren beschrieben, bei dem vesikelgebundene Theophyllin-Moleküle mit in Lösung befindlichen freien Theophyllin-Molekülen als Analyt um die Bindung an auf der Wellenleiteroberfläche immobilisierte anti-Theophyllin-Antikörper konkurrieren. Zugleich sind die Vesikel im hydrophilen Innern mit einer Vielzahl von Carboxy-Fluorescein-Molekülen als Fluoreszenzlabel beladen. In Abwesenheit von Theophyllin in einer zu untersuchenden Probe wird daher ein maximales, sehr hohes Fluoreszenzsignal beobachtet. Jedoch ist die Stabilität dieser Vesikels nicht durch Polymeren verstärkt, so dass durchaus ein gewisses Austreten

eingekapselter Fluoreszenzlabel, in Abhängigkeit von der spezifischen Zusammensetzung der Probe, zu erwarten ist.

In oberflächengebundenen Nachweisverfahren für einen Analyten wird ein Partner eines Affinitätssystems an einer festen Oberfläche, beispielsweise eines chemischen oder biochemischen Sensors, immobilisiert, um im nachfolgenden Nachweisverfahren den Analyten aus einer Probe spezifisch zu erkennen und zu binden. Dabei ist die Funktionalisierung der Oberfläche von entscheidender Bedeutung. Insbesondere im Falle umgebungs-empfindlicher biologischer Wechselwirkungen, wie beispielsweise mit Membranrezeptoren, ist die Beibehaltung der nativen Konformation des Erkennungselements zur Aufrechterhaltung der spezifischen Bindungsfähigkeit wesentlich. Zugleich ist es wichtig, unspezifische Bindung an die Oberfläche zu minimieren. Für den Analytnachweis an einer festen Oberfläche sind eine Vielzahl von Techniken bekannt.

Dabei kommt optischen Nachweismethoden, welche auf Wechselwirkungen im oberflächengebundenen Nahfeld des Sensors beruhen, eine besonders grosse Bedeutung wegen minimaler Störung der Bindungsvorgänge zu. Als derartige optische Nahfeldmethoden sind beispielsweise refraktive oder lumineszenzbasierende Nachweisverfahren im evaneszenten Feld eines Wellenleiters oder im Feld der Eindringtiefe eines in einem dünnen Metallfilms erzeugten Oberflächenplasmons bekannt (Surface Plasmon Resonance, SPR)

Fluoreszenzbasierende Nachweismethoden durch Fluoreszenzanregung im evaneszenten Feld planarer Wellenleiter sind beispielsweise in den WO 95/33197 und WO 95/33198 für diskrete Analytbestimmungen und in der WO 96/35940 für die gleichzeitige Bestimmung mehrerer Analyten beschrieben.

In einer besonderen Ausführungsform dieser Erfindung werden Lipide und amphiphile oder hydrophile Polymere in sterisch stabilisierte Vesikel überführt, welche ein biologisches oder biochemisches oder synthetisches Erkennungselement zur Erkennung und Bindung eines Liganden umfassen. Als "biologisches oder biochemisches oder synthetisches Erkennungselement" wird hierbei ein beliebiges biologisches Molekül oder Molekülkomplex oder künstlich daraus, chemisch oder genetisch, hergestellte Modifikation, oder synthetisches Molekül oder Molekülkomplex bezeichnet, welches spezifisch an eine beliebige andere

Verbindung bindet. Bevorzugt werden biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente verwendet aus der Gruppe bestehend aus Antikörpern, Antikörperfragmenten, Nukleinsäuren oder Nukleinsäure-Analoga, DNA, RNA, Enzymen, natürlichen und synthetischen Polypeptiden, Histidin-Tag-Komponenten und Membranrezeptoren. Bei der besagten anderen Verbindung kann es sich um Ionen, Atome, Cluster von Atomen, Moleküle, Molekülcluster, beliebige synthetische oder biologische Verbindungen oder Teile von ihnen handeln, welche durch das besagte Erkennungselement spezifisch erkannt und gebunden werden. Zur Gewährleistung einer ausreichenden Zugänglichkeit für den Liganden oder Analyten wird bevorzugt, dass die biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente an die Oberfläche des Vesikels assoziiert oder in diese integriert oder an das Polymere oder an die Lipide des Vesikels gebunden sind.

Die spezifische Erkennung und Bindung besagter Verbindung durch das bezeichnete Erkennungselement kann Teil eines bioanalytischen Nachweisverfahrens und damit ein weiterer Gegenstand der Erfindung sein.

Beispielsweise kann es sich bei besagter Verbindung um einen nachzuweisenden Analyten in einer Probe handeln. Dabei kann der Nachweis durch die Bestimmung der Änderung einer physikalisch messbaren Grösse als Folge der Bindung des Analyten selbst oder eines Analogens des Analyten (zum Beispiel in einem kompetitiven Nachweisverfahren) oder in einem mehrstufigen Bindungsvorgang, in dem der Analyt oder sein Analogon in einem Teilschritt gebunden wird, erfolgen. Die Änderung einer physikalisch messbaren Grösse kann beispielsweise durch eine nach Lichtanregung erfolgte Lumineszenz oder nach Anregung erfolgte Signale eines ESR- oder NMR-Labels oder durch Änderung der an einer Oberfläche adsorbierten molekularen Masse erfolgen. Der Nachweis kann in freier Lösung oder an einer festen Oberfläche, beispielsweise der Oberfläche eines Sensors, erfolgen.

Zur Minimierung unspezifischer Bindung der wie oben beschrieben rekonstituierten Vesikel wurden verschiedene Parameter wie die Zusammensetzung der Lipidmischung, die Ladung des Vesikels oder der modifizierten Sensoroberfläche, Zugabe von Detergentien und Ionenstärke des Puffers variiert. Auch wenn alle diese Parameter einen gewissen Beitrag

zur Herabsetzung der unspezifischen Bindung liefern können, war die verbleibende unspezifische Bindung im Endergebnis immer noch zu hoch.

Demgegenüber führte die Inkorporation von PEG-Lipiden in die Vesikel zu einer überraschenden, starken Verminderung der unspezifischen Bindung. Zwar verringert sich aufgrund sterischer Hinderung auch das spezifische Bindungssignal. Im Endergebnis wird jedoch eine deutliche Verbesserung des Verhältnisses von spezifischem zu unspezifischem Signal erzielt, was für die Messtechnik die entscheidende Grösse ist. Der Einfluss der Inkorporation des Polymeren in die Vesikel auf die beobachteten Bindungssignale kann folgendermassen erklärt werden: Das Polymere bildet eine sterische Barriere um die Membranen und führt damit zu der beobachteten Verminderung der unspezifischen Bindung. Es wurden PEG-Lipide unterschiedlicher Kettenlänge von PEG (mit Molekulargewichten von 750, 2000 und 5000 Dalton) eingesetzt.

Das nachfolgende Beispiel erläutert die Erfindung näher.

## **Beispiel**

### **Instrumentierung**

Das bioanalytische Nachweisverfahren wurde mit einer kommerziellen SPR-Apparatur (Biacore 1000, Upsala, Schweden) durchgeführt. Wenn nicht anders bezeichnet, fand das Verfahren unter konstantem Durchfluss bei einer Flussrate von 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  bei 25°C statt.

a)

### **Funktionalisierung von Sensoroberflächen**

Monomolekulare Schichten wurden durch Selbstorganisation (self-assembled monolayers, SAM's) von 16-Mercapto-Hexadekansäure und 11-Mercaptoundekanol auf der reinen Goldoberfläche von SPR-Sensor-Chips J1 (Biacore) ausserhalb des Geräts in einer mit Ethanol gesättigten Kammer hergestellt, um ein Verdampfen des Lösungsmittels zu vermeiden. Dazu wurde eine Lösung mit 1 mM 16-Mercaptohexadekansäure und 1.5 mM 11-Mercaptoundekanol (aus Mischung von je 40  $\mu\text{L}$  Vorratslösung von 4 mM 16-Mercapto-Hexadekansäure in 1:1 Wasser / Ethanol und 6 mM 11-Mercaptoundekanol in Ethanol mit 80  $\mu\text{L}$  Ethanol) in 1:7 Wasser/Ethanol in Teilmengen (*aliquots*) von 30  $\mu\text{L}$  auf die Sensoroberfläche gegeben. Nach 30 Minuten wurde die Lösung erneuert, was zur Ausbildung einer gemischten monomolekularen selbstorganisierten Schicht (SAM) nach 80 bis 100 Minuten führte.

Nach Einsetzen des SPR-Chips in die SPR-Apparatur wurde die SAM mittels des folgenden Verfahrens funktionalisiert: Die Sensoroberfläche wurde zunächst mit HEPES-gepufferter Salzlösung (HBS: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 % Tween 20, pH 7.4) bei einer Flussrate von 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  gespült.

Dann wurden 20  $\mu\text{L}$  von 0.2 M *N*-Ethyl-*N'*-Dimethylaminopropyl-Carbodiimid (EDC) / 0.05 M *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) bei einer reduzierten Flussrate von 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ , gefolgt von einer Injektion von 50  $\mu\text{L}$  einer Streptavidin-Lösung in 1:3 Wasser/HBS (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) und einer weiteren Injektion von 35  $\mu\text{L}$  Ethanolamin-Lösung (1 M, pH 8.5), jeweils bei einer Flussrate von 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Abschliessend wurde  $\alpha$ -Bungarotoxin (BgTx) an die Oberfläche gebunden mittels zweiminütiger Zufuhr einer Lösung von biotinyliertem  $\alpha$ -Bungarotoxin (biot-BgTx) in HBS (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

b)

**Rekonstitution von Nikotin-Acetylcholinrezeptoren (nAChR) in Lipid-Vesikeln**

In Chloroform gelöste Lipide wurden im gewünschten Verhältnis (typischerweise 80 mol % 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylcholin (DOPC), 10 % Cholesterol (Chol), und 10 % 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphatidylglycerol (DOPG)) gemischt. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde der abgeschiedene Lipidfilm wiederum gelöst unter Zugabe von 480 µL Puffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, pH 7.4) und von 270 µL zehnprozentigem (w/w) CHAPS, um nach anschliessender Ultraschallung eine endgültige Lipidkonzentration von 2 mg/mL zu erhalten. 250 µL angereicherter Rezeptormembranen (1.9 mg/mL) wurden hinzugefügt und die erhaltene Suspension nach Schütteln zentrifugiert, um ungelöstes Material zu entfernen. Lipidvesikel wurden hergestellt durch Dialyse des Überstands gegen ein 650-faches Puffervolumen (500 mM NaCl, 10 mM HEPES, 3 mM EDTA, 1 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7.4) in einem "Slide-a-Lyser", zunächst 30 Minuten lang bei Raumtemperatur, dann 8 bis 15 Stunden lang und abschliessend nochmals 2 bis 4 Stunden lang, wobei der Dialyse-Puffer bei jedem Schritt ausgetauscht wurde. Die dialysierten Vesikel wurden bis zu zwei Tage lang aufbewahrt und vor der Durchführung von SPR-Messungen nochmals zentrifugiert, um aus nicht rekonstituierten Rezeptoren entstandene Aggregate zu entfernen. Sofern nicht anders festgestellt, wurden alle Schritte bei 4°C durchgeführt.

Die Konzentrationen der in die Vesikel inkorporierten Rezeptoren wurden bestimmt durch Messung der optischen Dichte bei 280 nm ( $\epsilon = 450\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) in Gegenwart eines hohen Überschusses von CHAPS, um die Vesikel zu lösen und Lichtstreu-Effekte zu vermindern. Unter der Annahme, dass die beobachtete Absorption ausschliesslich durch nAChR verursacht wurde, wurden typische Rezeptorkonzentrationen von 350 nM bestimmt. Mittels quasi-elastischer Lichtstreuung nach Standard-Verfahren wurde eine enge Grössenverteilung der Vesikel, mit einem Durchmesser von 18 – 20 nm, bestimmt. Mit einer typischen Oberfläche von  $60\text{ Å}^2$  pro Lipidmolekül wurde abgeschätzt, dass im Durchschnitt ein Vesikel jeweils 4000 Lipidmoleküle und 0.5 Rezeptoren enthielt.



### Unspezifische Bindung von nAChR-Vesikeln

(1) Vier Lösungen von nAChR-Vesikeln (Lösungen (1) – (3) ohne, (4) mit 2 % PEG-Lipiden) wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren hergestellt. Die Lösungen (1) bis (3) wurden gegen ein 650-faches Puffervolumen (10 mM HEPES, 3 mM EDTA, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , pH 7.4) bei Raumtemperatur dialysiert. Die Dialysepuffer für (1) und (2) enthielten zusätzlich 500 mM NaCl, für (3) zusätzlich 500 mM NaCl und CHAPS in einer Konzentration entsprechend einem Zehntel der kritischen micellaren Konzentration (CMC), d. h. ca. 0.5 mM. Nach 30 Minuten wurden die Puffer erneuert, und die Ionenstärke des Puffers (1) wurde von 500 mM NaCl auf 300 mM NaCl verringert. Nach 5 Stunden weiterer Dialyse bei 4°C wurden die Puffer nochmals erneuert, wobei die Ionenstärke des Puffers (1) weiter auf 150 mM NaCl verringert wurde. Nach 10 Stunden bei 4°C wurde die Dialyse abgeschlossen.

Zur Verringerung der unspezifischen Bindung von Lipiden wurde die Sensoroberfläche vorbehandelt mit einer Mischung mit einer molaren Zusammensetzung aus 70 % DOPC (1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin), 10 % DOPG (1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylglycerol), 10 % Chol, 3 % 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-Phosphatidsäure [Poly(ethylenglycol)]ester ( $M_r$  PEG = 750, DMPA-PEG<sub>750</sub>), 3 % 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-phosphatoethanolamin-*N*-[poly(ethylenglycol)] ( $M_r$  PEG = 2000, POPE-PEG<sub>2000</sub>) und ), 3 % 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-phosphatoethanolamin-*N*-[poly(ethylenglycol)] ( $M_r$  PEG = 5000, POPE-PEG<sub>5000</sub>) in einem Puffer aus 150 mM NaCl, 10 mM HEPES, 3 mM EDTA, 1 mM  $\text{NaN}_3$  bei pH 7.4.

(2) Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung der Vesikel an die mit BgTx als immobilisiertem Erkennungselement modifizierte Sensoroberfläche wurden alle Bindungsstellen von nAChR für BgTx an den Vesikeln mit einem hohen Überschuss von BgTx abgesättigt und anschliessend in Lösung des entsprechenden Dialysepuffers die Bindung der abgesättigten Vesikel an die BgTx-modifizierte Sensoroberfläche als Signal für die unspezifische Bindung gemessen. Anschliessend wurde das spezifische Bindungssignal als Differenz zwischen dem totalen Bindungssignal mit nicht BgTx-abgesättigten Vesikeln und dem unspezifischen Signal bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1:

	Gesamt-signal (kRU)	Unspezif. Signal (kRU)	Spezif. Signal (kRU)	Spezif./ Unspezif. Signal
Standard-Vesikel	0.624	0.395	0.229	0.56
SSV, MW <sub>PEG</sub> = 750	0.604	0.234	0.37	1.58
SSV, MW <sub>PEG</sub> = 2000	0.474	0.160	0.314	1.96
SSV, MW <sub>PEG</sub> = 5000	0.151	0.071	0.080	1.13

In dem vorliegenden Beispiel wurde ein maximales Verhältnis von spezifischem zu unspezifischem Signal bei PEG-Lipiden mit einem PEG-Molekulargewicht von 750 bis 2000 Dalton beobachtet. Der Anteil von PEG-Lipiden an der Gesamtzahl der vesikelbildenden Lipide wurde ebenfalls variiert in einem Bereich von 0 % bis 10 %. Dabei zeigte sich die Tendenz, dass insbesondere bei länger-kettigen Polymeren ein hoher Anteil zu einer nachteiligen Herabsetzung des spezifischen Bindungssignals infolge sterischer Hinderung führt. Die optimale Auswahl der Polymerkettenlänge und der optimale Anteil polymergekoppelter Lipide ist gemäss dieser Erfindung abhängig von der Grösse des vesikelassoziierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselements und der Zugänglichkeit für den zu bindenden Analyten, mit der Tendenz zur Bevorzugung relativ langkettiger Polymeren und / oder eines hohen Anteils an der Gesamtzahl von Lipidmolekülen im Falle grosser Erkennungselemente bzw. relativ kurzkettiger Polymeren und / oder eines kleinen Anteils im Falle kleiner Erkennungselemente.

**Patentansprüche**

1. Ein biologisches oder biochemisches Reagens, dadurch gekennzeichnet, dass es
  - A) ein Vesikel,
  - B) ein oder mehrere an die innere und / oder äussere Oberfläche des Vesikels gebundene Polymere und
  - C) mindestens ein an das Vesikel gebundenes oder adsorbiertes oder an das Polymere gebundenes oder adsorbiertes biologisches oder biochemisches oder synthetisches Erkennungselement zur Erkennung und Bindung eines Liganden umfasst.
2. Biologisches oder biochemisches Reagens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein biologisches oder biochemisches oder synthetisches Erkennungselement ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Antikörpern, Antikörperfragmenten, Nukleinsäuren oder Nukleinsäure-Analoga, DNA, RNA, Enzymen, natürlichen und synthetischen Polypeptiden, Histidin-Tag-Komponenten und insbesondere Membranrezeptoren.
3. Biologisches oder biochemisches Reagens nach einem der Ansprüche 1 - 2, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein biologisches oder biochemisches oder synthetisches Erkennungselement an die Oberfläche des Vesikels assoziiert oder in diese integriert oder an das Polymere oder an die Lipide des Vesikels gebunden ist.
4. Biologisches oder biochemisches Reagens nach einem der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, dass als stabilisierendes Polymer ein wasserlösliches Polymer verwendet wird.
5. Biologisches oder biochemisches Reagens nach einem der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, dass als stabilisierendes Polymer ein hydrophiles Polymeres aus der Gruppe, bestehend aus Polyethylenglycolen, bevorzugt mit einem Molekulargewicht von 750 bis 2000 Dalton, Polypeptiden, Polysulfoxiden, Kohlenhydraten wie beispielsweise Dextranen und dendritischen hydrophilen Polymeren, verwendet wird.

6. Biologisches oder biochemisches Reagens nach einem der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Vesikel unilamellar ist.
7. Biologisches oder biochemisches Reagens nach einem der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Vesikel Lipide umfasst aus der Gruppe bestehend aus natürlich vorkommenden Lipiden wie Glycerophospholipiden, wie beispielsweise Phosphatidylcholin, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylserin, Phosphatidsäure, Sphingomyelin, Glycolipiden, Sterolen wie beispielsweise Cholesterol, Cardiolipin, Plasmalogen, in Archaeobakterien vorkommenden Lipiden, beispielsweise solche mit an Äthergruppen gekoppelten Kohlenwasserstoffketten, verzweigten Kohlenwasserstoffketten oder Kohlenwasserstoffketten mit aliphatischen Ringstrukturen oder bipolaren Lipiden, künstliche Lipide, wie positiv geladene Lipide, wie beispielsweise Dodecylammoniumbromid (DODAB) oder Boloamphiphile, sowie künstliche Lipide, welche fluoridierte oder halogenierte Lipidkohlenwasserstoffketten oder aktivierbare oder polymerisierbare Gruppen enthalten.
8. Biologisches oder biochemisches Reagens nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, dass es zusätzlich ein Label als signalerzeugende Komponente zur Detektion in einem bioanalytischen Nachweisverfahren umfasst, wobei vorzugsweise das Label als signalerzeugende Komponente mit dem Vesikel assoziiert ist.
9. Biologisches oder biochemisches Reagens nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das zusätzliche mindestens eine Label als signalerzeugende Komponente sich im Innern des Vesikels befindet oder an die äussere Hülle des Vesikels direkt oder über einen Spacer oder über das Polymere gebunden ist.
10. Biologisches oder biochemisches Reagens nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das zusätzliche eine Label als signalerzeugende Komponente ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus ESR- oder NMR-Spin-Labeln, Massenlabeln, elektrochemischen Labeln oder insbesondere Lumineszenzlabeln oder Fluoreszenzlabeln.

11. Biologisches oder biochemisches Reagens nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass als signalerzeugende Komponenten eine Vielzahl von gleichartigen Lumineszenz- oder Fluoreszenzlabeln mit dem Vesikel assoziiert sind oder mehrere Lumineszenz- oder Fluoreszenzlabel unterschiedlicher Emissionswellenlänge und gleicher oder unterschiedlicher Anregungswellenlänge mit dem Vesikel assoziiert sind.
12. Biologisches oder biochemisches Reagens nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass als Lumineszenz- oder Fluoreszenzlabel lumineszente oder fluoreszente Nanopartikel verwendet werden.
13. Verfahren zur Herstellung eines biologischen oder biochemischen Reagens gemäss einem der Ansprüche 1 – 12, dadurch gekennzeichnet, dass man
- A) die für die Vesikelherstellung mittels Dialyse benötigten Lipidmoleküle,
  - B) eine oder mehrere an die innere und / oder äussere Hülle des Vesikels zu bindende Polymermoleküle und
  - C) mindestens ein an das Vesikel zu bindendes oder zu adsorbierendes oder an ein Polymermolekül zu bindendes oder zu adsorbierendes biologisches oder biochemisches Erkennungselement zur Erkennung und Bindung eines Liganden
- in sequentiellen Mischungs- und Verdampfungsschritten zusammenbringt.
14. Bioanalytisches Nachweisverfahren unter Verwendung eines biologischen oder biochemischen Reagens nach einem der Ansprüche 1 – 12.
15. Bioanalytisches Nachweisverfahren nach Anspruch 14 unter Verwendung eines biologischen oder biochemischen Reagens nach einem der Ansprüche 1 – 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Nachweis des Analyten mittels einer Methode ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus elektrochemischer Detektion, Impedanzspektroskopie, Elektronenspinresonanz, Kernspinresonanz, Schwingquarzmessungen und insbesondere der Detektion optischer Signaländerungen oder einer Kombination dieser Verfahren erfolgt.
16. Bioanalytisches Nachweisverfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der optischen Signaländerung

mithilfe eines als Sensorplattform dienenden optischen Sensors erfolgt, wobei vorzugsweise der optische Sensor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus optischen Wellenleitersensoren oder Oberflächenplasmonensensoren.

17. Bioanalytisches Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 15 - 16, dadurch gekennzeichnet, dass die zu bestimmende optische Signaländerung auf der Änderung des effektiven Brechungsindex im Nahfeld der Sensoroberfläche oder insbesondere einer im Nahfeld des Sensors erzeugten Lumineszenz oder Fluoreszenz beruht.
18. Bioanalytisches Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 16 - 17, dadurch gekennzeichnet, dass als Sensorplattform ein planarer oder faserförmiger Wellenleiter verwendet wird.
19. Bioanalytisches Nachweisverfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass als Sensorplattform ein planarer Dünnschichtwellenleiter verwendet wird, welcher eine erste optisch transparente Schicht (a) auf einer zweiten optisch transparenten Schicht (b) umfasst.
20. Bioanalytisches Nachweisverfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht in den als Sensorplattform dienenden planaren Dünnschichtwellenleiter über ein oder mehrere Gitter (c) eingekoppelt wird.
21. Bioanalytisches Nachweisverfahren mit einer Sensorplattform nach einem der Ansprüche 16 - 20, dadurch gekennzeichnet, dass sich zwischen den optisch transparenten Schichten (a) und (b) und in Kontakt mit Schicht (a) eine weitere optisch transparente Schicht (b') mit niedrigerem Brechungsindex als dem der Schicht (a) und einer Stärke von 5 nm - 1000 µm, vorzugsweise von 10 nm - 1000 nm, befindet.
22. Bioanalytisches Nachweisverfahren mit einer Sensorplattform nach einem der Ansprüche 16 - 21, dadurch gekennzeichnet, dass zur Immobilisierung biologischer oder biochemischer Erkennungselemente (e) auf der optisch transparenten Schicht (a) eine Haftvermittlungsschicht (f) aufgebracht ist.

23. Bioanalytisches Nachweisverfahren mit einer Sensorplattform nach einem der Ansprüche 19 - 22, dadurch gekennzeichnet, dass der als Sensorplattform dienende Dünnschichtwellenleiter mehrere Messbereiche (d) zur gleichzeitigen oder sequentiellen Bestimmung einer oder mehrerer Analyten aus einer oder mehreren Proben umfasst.
24. Bioanalytisches Nachweisverfahren mit einer Sensorplattform nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass räumlich getrennte Messbereiche (d) durch räumlich selektive Aufbringung von biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen auf besagter Sensorplattform erzeugt werden.
25. Bioanalytisches Nachweisverfahren mit einer Sensorplattform nach einem der Ansprüche 20 - 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Gitterstruktur (c) eine senkrecht oder parallel zur Ausbreitungsrichtung des in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelten Anregungslichts räumlich variierende Periodizität aufweist.
26. Bioanalytisches Nachweisverfahren mit einer Sensorplattform nach einem der Ansprüche 19 - 25, dadurch gekennzeichnet, dass das Material der zweiten optisch transparenten Schicht (b) aus Glas, Quarz oder einem transparenten thermoplastischen Kunststoff aus der Gruppe besteht, die von Polycarbonat, Polyimid oder Polymethylmethacrylat gebildet wird.
27. Bioanalytisches Nachweisverfahren mit einer Sensorplattform nach einem der Ansprüche 19 - 26, dadurch gekennzeichnet, dass der Brechungsindex der ersten optisch transparenten Schicht (a) grösser als 2 ist.
28. Bioanalytisches Nachweisverfahren mit einer Sensorplattform nach einem der Ansprüche 19 - 27, dadurch gekennzeichnet, dass die Dicke der ersten optisch transparenten Schicht (a) 40 nm bis 300 nm beträgt.
29. Bioanalytisches Nachweisverfahren mit einer Sensorplattform nach einem der Ansprüche 20 - 28, dadurch gekennzeichnet, dass das Gitter (c) eine Periode von 200 nm – 1000 nm aufweist und die Modulationstiefe des Gitters (c) 3 nm bis 100 nm, bevorzugt 10 nm bis 30 nm beträgt.

30. Bioanalytisches Nachweisverfahren mit einer Sensorplattform nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis von Modulationstiefe zur Dicke der ersten optisch transparenten Schicht (a) gleich oder kleiner als 0,2 ist.
31. Bioanalytisches Nachweisverfahren mit einem optischen System zur Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen, mit mindestens einer Anregungslichtquelle einer Sensorplattform nach einem der Ansprüche 19 – 30 mindestens einem Detektor zur Erfassung des von dem mindestens einem oder mehreren Messbereichen (d) auf der Sensorplattform ausgehenden Lichts.
32. Bioanalytisches Nachweisverfahren mit einer Sensorplattform nach einem der Ansprüche 20 - 31, dadurch gekennzeichnet, dass das von der mindestens einen Lichtquelle ausgesandte Anregungslicht kohärent ist und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf die einen oder mehreren Messbereiche eingestrahlt wird.
33. Bioanalytisches Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 17 - 32, dadurch gekennzeichnet, dass zur Detektion mindestens ein ortsauflösender Detektor verwendet wird.
34. Bioanalytisches Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 17 - 33, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen der einen oder mehreren Anregungslichtquellen und der Sensorplattform und /oder zwischen besagter Sensorplattform und dem einen oder mehreren Detektoren optische Komponenten aus der Gruppe verwendet werden, die von Linsen oder Linsensystemen zur Formgestaltung der übertragenen Lichtbündel, planaren oder gekrümmten Spiegeln zur Umlenkung und gegebenenfalls zusätzlich zur Formgestaltung von Lichtbündeln, Prismen zur Umlenkung und gegebenenfalls zur spektralen Aufteilung von Lichtbündeln, dichroischen Spiegeln zur spektral selektiven Umlenkung von Teilen von Lichtbündeln, Neutralfiltern zur Regelung der übertragenen Lichtintensität, optischen Filtern oder Monochromatoren zur spektral selektiven Übertragung von Teilen von Lichtbündeln oder polarisationsselektiven Elementen zur Auswahl



diskreter Polarisationsrichtungen des Anregungs- oder Lumineszenzlichts gebildet werden.

35. Bioanalytisches Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 17 - 34, dadurch gekennzeichnet, dass die Einstrahlung des Anregungslichts auf und Detektion des Emissionslichts von einem oder mehreren Messbereichen sequentiell für einzelne oder mehrere Messbereiche erfolgt.
36. Bioanalytisches Nachweisverfahren nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, dass sequentielle Anregung und Detektion unter Verwendung beweglicher optischer Komponenten erfolgt, die aus der Gruppe von Spiegeln, Umlenkprismen und dichroischen Spiegeln gebildet wird.
37. Bioanalytisches Nachweisverfahren nach Anspruch 35 oder 36, dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorplattform zwischen Schritten der sequentiellen Anregung und Detektion bewegt wird.
38. Bioanalytisches Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 17 - 37, dadurch gekennzeichnet, dass das eine oder die mehreren zum Nachweis des Analyten verwendeten Lumineszenz- oder Fluoreszenzlabel an den Analyten oder in einem kompetitiven Assay an einen Analogen des Analyten oder in einem mehrstufigen Assay an einen der Bindungspartner des Analyten oder der eingesetzten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente gebunden sind.
39. Bioanalytisches Nachweisverfahren nach einem der Ansprüche 17 - 38, dadurch gekennzeichnet, dass (1) die isotrop abgestrahlte Lumineszenz oder (2) in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelte und über die Gitterstruktur (c) ausgekoppelte Lumineszenz oder Lumineszenzen beider Anteile (1) und (2) gleichzeitig gemessen werden.
40. Bioanalytisches Nachweisverfahren nach mindestens einem der Ansprüche 14 - 39 zur gleichzeitigen oder sequentiellen, quantitativen oder qualitativen Bestimmung eines oder mehrerer Analyten aus der Gruppe von Antikörpern oder Antigenen, Rezeptoren oder Liganden, Chelatoren oder "Histidin-tag-Komponenten", Oligonukleotiden, DNA-

oder RNA-Strängen, DNA- oder RNA-Analoga, Enzymen, Enzymcofaktoren oder Inhibitoren, Lektinen und Kohlehydraten.

41. Bioanalytisches Nachweisverfahren nach mindestens einem der Ansprüche 14 – 40, dadurch gekennzeichnet, dass die zu untersuchenden Proben natürlich vorkommende Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Lymphe oder Urin oder Eigelb oder optisch trübe Flüssigkeiten oder Oberflächenwasser oder Boden- oder Pflanzenextrakt oder Bio- oder Syntheseprozessbrühen oder aus Gewebeteilen lebender oder verstorbener Organismen entnommen sind.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No

PCT/EP 00/04491

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 683 397 A (NISSUI SEIYAKU CO) 22 November 1995 (1995-11-22) abstract column 6, line 39 - line 42 column 7, line 8 -column 8, line 39; example 1	1-15
X	EP 0 475 786 A (WAKO PURE CHEM IND LTD) 18 March 1992 (1992-03-18) page 3, line 46 - line 58 page 9, line 47 -page 10, line 4; table 2	1-15
X	WO 97 35561 A (RUBINSTEIN ISRAEL ;UNIV ILLINOIS (US); ONYUKSEL HAYAT (US)) 2 October 1997 (1997-10-02) cited in the application page 5; claims 1-5,13-15,19-22	1-13
	-/-	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&amp;\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 November 2000

Date of mailing of the international search report

20/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2

NL - 2280 HV Rijswijk

Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,

Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hart-Davis, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internatic Application No

PCT/EP 00/04491

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HARRISON B A ET AL: "A kinetics approach to the characterization of an IgM specific for the glycolipid asialo-6M1" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, vol. 212, no. 1, 1998, pages 29-39, XP004143113 ISSN: 0022-1759 abstract page 31, column 2, paragraph 3 -page 34, column 1, paragraph 2	1,15-41
X	US 5 891 468 A (ZALIPSKY SAMUEL ET AL) 6 April 1999 (1999-04-06) cited in the application column 6, line 24 - line 65; figure 4 column 11, line 25 -column 12, line 35	1-13
A	US 5 494 803 A (CARBONELL RUBEN G ET AL) 27 February 1996 (1996-02-27) column 1 -column 4; figures 1,2	1,15-41
P,A	EFREMOVA NADEZHDA V; BONDURANT BRUCE; O'BRIEN DAVID F; LECKBAND DEBORAH E: "Measurements of interbilayer forces and protein adsorption on uncharged lipid bilayers displaying poly(ethylene glycol) chains" BIOCHEMISTRY, vol. 39, 28 March 2000 (2000-03-28), pages 3441-3451, XP002152050 page 3447, column 2 -page 3449, column 2	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 00/04491

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0683397	A	22-11-1995	JP 2711974 B	10-02-1998
			JP 6230010 A	19-08-1994
			US 5756363 A	26-05-1998
			CA 2153874 A	18-08-1994
			WO 9418567 A	18-08-1994
EP 0475786	A	18-03-1992	AT 140541 T	15-08-1996
			DE 69120883 D	22-08-1996
			DE 69120883 T	06-03-1997
			JP 6186233 A	08-07-1994
WO 9735561	A	02-10-1997	AU 2426197 A	17-10-1997
			AU 2549297 A	17-10-1997
			CA 2250219 A	02-10-1997
			EP 0914094 A	12-05-1999
			WO 9735560 A	02-10-1997
US 5891468	A	06-04-1999	US 6056973 A	02-05-2000
			AU 715063 B	13-01-2000
			AU 4987897 A	11-05-1998
			BR 9712230 A	25-01-2000
			EP 0932391 A	04-08-1999
			WO 9816202 A	23-04-1998
US 5494803	A	27-02-1996	WO 9310226 A	27-05-1993

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 G01N33/543

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)  
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 683 397 A (NISSUI SEIYAKU CO) 22. November 1995 (1995-11-22) Zusammenfassung Spalte 6, Zeile 39 - Zeile 42 Spalte 7, Zeile 8 - Spalte 8, Zeile 39; Beispiel 1	1-15
X	EP 0 475 786 A (WAKO PURE CHEM IND LTD) 18. März 1992 (1992-03-18) Seite 3, Zeile 46 - Zeile 58 Seite 9, Zeile 47 - Seite 10, Zeile 4; Tabelle 2	1-15
X	WO 97 35561 A (RUBINSTEIN ISRAEL ; UNIV ILLINOIS (US); ONYUKSEL HAYAT (US)) 2. Oktober 1997 (1997-10-02) in der Anmeldung erwähnt Seite 5; Ansprüche 1-5, 13-15, 19-22	1-13
	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. November 2000

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

20/11/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hart-Davis, J

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	HARRISON B A ET AL: "A kinetics approach to the characterization of an IgM specific for the glycolipid asialo-GM1" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, Bd. 212, Nr. 1, 1998, Seiten 29-39, XP004143113 ISSN: 0022-1759 Zusammenfassung Seite 31, Spalte 2, Absatz 3 -Seite 34, Spalte 1, Absatz 2 -----	1,15-41
X	US 5 891 468 A (ZALIPSKY SAMUEL ET AL) 6. April 1999 (1999-04-06) in der Anmeldung erwähnt Spalte 6, Zeile 24 - Zeile 65; Abbildung 4 Spalte 11, Zeile 25 -Spalte 12, Zeile 35 -----	1-13
A	US 5 494 803 A (CARBONELL RUBEN G ET AL) 27. Februar 1996 (1996-02-27) Spalte 1 -Spalte 4; Abbildungen 1,2 -----	1,15-41
P,A	EFREMOVA NADEZHDA V; BONDURANT BRUCE; O'BRIEN DAVID F; LECKBAND DEBORAH E: "Measurements of interbilayer forces and protein adsorption on uncharged lipid bilayers displaying poly(ethylene glycol) chains" BIOCHEMISTRY, Bd. 39, 28. März 2000 (2000-03-28), Seiten 3441-3451, XP002152050 Seite 3447, Spalte 2 -Seite 3449, Spalte 2 -----	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

International Aktenzeichen

PCT/EP 00/04491

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0683397	A	22-11-1995	JP	2711974 B	10-02-1998
			JP	6230010 A	19-08-1994
			US	5756363 A	26-05-1998
			CA	2153874 A	18-08-1994
			WO	9418567 A	18-08-1994
EP 0475786	A	18-03-1992	AT	140541 T	15-08-1996
			DE	69120883 D	22-08-1996
			DE	69120883 T	06-03-1997
			JP	6186233 A	08-07-1994
WO 9735561	A	02-10-1997	AU	2426197 A	17-10-1997
			AU	2549297 A	17-10-1997
			CA	2250219 A	02-10-1997
			EP	0914094 A	12-05-1999
			WO	9735560 A	02-10-1997
US 5891468	A	06-04-1999	US	6056973 A	02-05-2000
			AU	715063 B	13-01-2000
			AU	4987897 A	11-05-1998
			BR	9712230 A	25-01-2000
			EP	0932391 A	04-08-1999
			WO	9816202 A	23-04-1998
US 5494803	A	27-02-1996	WO	9310226 A	27-05-1993